第11卷 第3期 动 物 学 研 究 Vol. 11, No. 3
1990年8月 ZOOLOGICAL RESEARCH Aug., 1990

氨基酸和微量元素在虫草菌感染虫草蝠蛾幼虫中的影响*

杨跃雄 陆 源 杨大荣 董大志 沈发荣 何远辉 王达瑞 韩灯保
（中国科学院昆明动物研究所）

摘 要

本文收集了虫草蝠蛾2—6龄五个龄期组幼虫，四组处于不同发育阶段的虫草菌丝体、被虫草菌感染后的僵虫体、全虫草体及子实体共计12组样品的氨基酸、微量元素分析资料，应用聚类分析方法对各样品变量的分类单元及其贡献值进行初步探讨。结果显示：各样品间的氨基酸、微量元素组成水平各不相同，5、4龄幼虫的总体组成水平在比例关系上更接近全虫草体，虫草菌丝体愈培养至晚期就愈接近子实体的组成。分析认为，5、4龄虫易被感染与其氨基酸、微量元素的组成背景值有关；以培养至晚期的菌丝体或有性生殖孢子更易感染幼虫。

关键词：虫草蝠蛾幼虫，虫草菌，氨基酸，微量元素，聚类

聚类分析亦称群分析，是近年来发展起来的一门多元统计分类方法，已被引入动物分类学的研究（何纪昌，1984；凌作培，1987）和土壤微量元素背景值的数值分类研究（Kyuma，1976；Рожков，1977；杨国治，1983；李文银，1986；孟宪玺，1987）；还有人用于农作物中的微量元素背景值特征的研究（计维浓，1987）。笔者在对虫草菌寄生虫草蝠蛾幼虫的机制进行研究的同时，测定了各龄试虫及虫草菌的氨基酸和微量元素，取得大量分析数据，借助电子计算机，利用群分析的数学分析，试图揭示其中与感染有关的某些规律。应用数学模型分析它们的微量元素、氨基酸背景值对感染的影响，以期为人工控制虫草菌感染寄主，培养出冬虫夏草提供可资参考的依据。

材 料 和 方 法

一、材料

冬虫夏草、僵虫体（人工感染获得），2—6龄幼虫（均未感染）等材料由本所设

* 国家自然科学基金资助项目。
本所大型仪器组的同志协助分析样品，德钦县科委的喻润清、鲁白、春生、斯那都吉等同志参加野外材料收集工作，谨致谢意！
本文1988年1月26日收到，1989年6月7日修回。

在云南白马雪山的虫草研究基地提供（1龄虫因个体小而难于收集），虫草菌丝体由室内培养（分离自新鲜虫草的子座），分别取材培养45、60、80和100天的菌丝体4个组，2—6龄试虫5个组及全虫草、僵虫体、子实体3个组共计有12组样品。

二、测定方法

1. 氨基酸测定：定量称取以上各组样品，用重蒸去离子水洗涤，烘干制成粉末，然后各称取500mg，分别放入装有5ml分析纯浓硫酸（上海试剂总厂，86—08—12）的凯氏定氮烧瓶内，冷冻抽真空后密封，置110°C高温下水解至透明，稀释至适合上机的浓度，用瑞典产LKB-4400-020型氨基酸自动分析仪检测。

2. 微量元素测定：选同上12组样品，具体样品处理和测定见杨跃雄（1987）的方法，用美国产IL-plasma-200型电感耦合等离子体发射光谱仪检测。

3. 将各测定数据输入IMP-PC型微机，Basic语言编制程序进行计算。聚类方法选用图论聚类法（潘恩沛，1984）。

结 果 和 讨 论

幼虫的不同发育历期；虫草菌的不同生长期；僵虫、子实体等均可看做是冬虫夏草的不同发育历期。在研究它们的氨基酸、微量元素背景值特征过程中发现：各样品间存在着一些亲疏关系。现采用图论聚类的数学方法对它们的氨基酸、微量元素组成的相似关系进行分类尝试。

对12个样品组分别编号为1，2，……12。每组样品的测定指标各有35项（18项微量元素指标：Na Ca Mg Mn Fe Cu Zn Co V Ni Cr Cd Al B Pb Si Mo P；17项氨基酸指标：天门冬氨酸、苏氨酸、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、氨等）。将其看做每组样品的各35维向量。一个含多变量的样品可以由多维空间的一点代表。由于各氨基酸和微量元素的观测值因量纲不同，或量纲虽然相同而数量水平（量级）不同，均可能对数值分类带来不合理的影响。为消除这些影响，应对各指标值（原始数据）进行标准化变换处理。本文采用标准差标准化方法（刘多森，1979），得到12 × 35 = 420个标准化数据。

在聚类分析中，表示两样品间亲疏程度的统计量，常用的有以下两种：

1. 第i，j个样品间的绝对值距离$d_{ij}(1)$

$$d_{ij}(1) = \sum_{t=1}^{m} \left| x_{it} - x_{jt} \right|$$

$$(i, j = 1, 2, \cdots\cdots n)$$

式中i，j为样品的编号，t是样品指标的编号，n为样品的总个数，m为指标总个数，x_{it}和x_{jt}分别为第i，j个样品的第t个指标的观测值。绝对值距离愈小，表示两样品间的关系愈亲近，反之愈远。

2. 第i，j个样品间的欧几里德距离$d_{ij}(2)$

$$d_{ij}(2) = \left[\sum_{t=1}^{m} (x_{it} - x_{jt})^2\right]^{\frac{1}{2}}$$

式中各符号及意义同前。

我们可以把每一样品看作一个环境域，每样品的各项指标看作影响该环境域的标准化值，按照环境科学的一般理解，环境域某点位标准化值较高的物质对该点位逆质量负荷，要比对该点位各物质含量标准化值的平均值的负荷更大。在这一意义上讲，欧氏距离可能比绝对值距离更适合用于本文中各样品间亲疏关系的评价，因为欧氏距离强调了二点位标准化值之差较大的物质对该环境域的影响。

根据各测定样品提供的数据，利用图论聚类$d_{ij}(2)$程序（潘恩沛，1984）算出多维空间（指标）联接各样品点的最小支撑树，找出最小支撑树的长边（欧氏距离），即可定量地表示出每两样品点间的亲疏程度。本文$d_{ij}(2)$式中$m=35$（样品指标），$n=12$（样品数），一个含多变量的样品可以用多维空间的一个点来代表。从几何角度上讲，在多维空间中，如果样品点在某些区域内密度很高，在另一些区域很低甚至空白，且高密度区被空白或低密度区分隔，这就形成一个最自然的能体现样品点分布结构的聚类。

现在来定义最小支撑树，m维空间中n个样品点间形成的一切可能联接图中，存在着一个不形成回路，且各边长总和为最小值的联接图即最小支撑树，它反映了与每个样品点最近的一些样品点，反映了样品点之间联接的亲疏程度。

本程序的具体算法是：从任意选定的一点A_1开始，计算A_1与其余各点的边长，设其中L_1为最短的，其另一端为A_2，再通过A_1，A_2找出除L_1外的最短边，设为L_2，其另一端为A_3……直到将12个点（样品）全部联接起来，这样便形成最小支撑树。

根据上述方法，用Basic语言编制程序，在IMP-PC型微机上进行计算，结果列成聚合顺序表（表1），由表1得出最小支撑树图1。

表1　五个龄期幼虫、四个发育历期虫草菌、虫草、僵虫等的欧氏距离矩阵及最短距离顺序

j \ i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	31.71*	9.04	30.26	12.08	31.93	22.55	23.03	26.19	32.41	14.28	12.26
2	43.54	0	15.85	8.56	18.29	41.55	31.60	33.55	36.16	13.82	17.16	32.75
3	9.04	15.85	0	33.35	12.99	35.50	22.58	24.79	25.23	3.56	15.36	24.06
4	30.26	8.56	33.55	0	32.92	29.22	38.76	27.13	32.19	2.13	29.97	22.31
5	12.08	18.29	12.99	32.92	0	36.50	24.26	27.97	30.18	6.33	15.52	27.23
6	31.93	41.54	35.60	29.22	36.54	0	26.61	8.98	19.80	34.02	9.76	13.15
7	22.55	31.64	22.58	38.76	24.26	26.61	0	20.93	6.74	22.37	35.07	20.58
8	23.03	33.53	24.79	27.13	27.97	8.98	20.93	0	3.83	25.03	27.65	10.26
9	26.19	36.16	25.53	32.19	30.18	19.08	6.74	3.83	0	27.75	29.69	1.85
10	32.41	13.82	3.56	2.13	6.33	34.02	22.34	25.03	27.78	0	8.66	24.27
11	14.21	17.16	15.36	29.97	15.52	9.76	35.07	27.65	29.69	8.66	0	27.04
12	12.26	32.75	24.06	22.31	27.23	13.15	20.58	10.26	1.85	24.27	27.04	0

（一）＊表中仅列0.01位有效数字。

最短距离顺序	两两样品号	
distances	i： =	j： =
1.857631	9	12
2.138437	4	10
3.562385	3	10
3.832741	8	9
6.339176	5	10
6.741832	7	9
8.567728	4	2
8.669321	10	11
8.984723	6	8
9.762754	6	11
12.267345	1	12

（二）

（一）：第 i 与第 j 个样品间的欧氏距离矩阵。

（二）：第 i 与第 j 个样品间的最短欧氏距离顺序。

表中 i，j = 1，2，……12。

其中 1 — 5 表示 2 — 6 龄组幼虫；6 — 9 表示培养45、60、80、100 天的虫草菌；10、11、12 各表示全虫草组、僵虫组、子实体组样品。

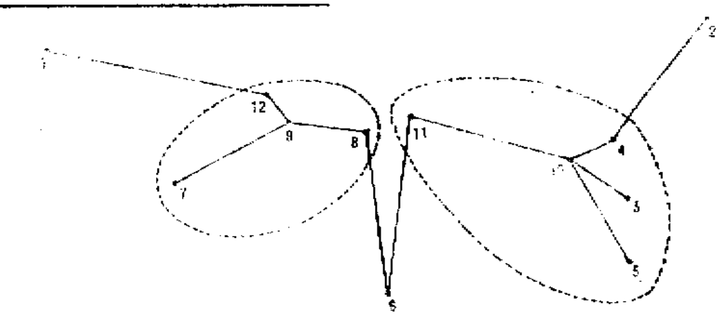


图 1　幼虫、虫草菌、全虫草、僵虫、子实体等12个样品组间的最小支撑树（联接图）
图中各符号及意义同表 1（二）

结果显示：根据各样品点的氨基酸、微量元素组成水平可将它们分为三个组别。第 1 组：4 、5 、6 龄幼虫；僵虫体等分别与全虫草体的组成水平最接近，前者与后者的亲近程度分别是：5 龄虫＞4 龄＞6 龄＞僵虫体。第 2 组：培养60、80、100天的虫草菌丝体与子实体为一自然聚类群，前者与后者的亲近顺序是100＞80＞60天培养菌丝体。剩下的 2 、3 龄虫、45天培养菌丝体与其他样品的亲近程度均相对较远，将其划为第 3 组（与其他样品点的欧氏距离均在8.56以上）。

聚类分析是通过对样品各变量以及样品间的一系列处理，并通过数学模型建立聚类谱系图，从而直观清晰地反映有关各样品类型之间的亲疏序列，并能反映各样品变量的相互关系，以显示各样品属性的多因素综合特征，从而合理准确地区分样品类型。根据每个样品中的氨基酸、微量元素组成水平，将12个样品经过聚类分析划分为三个组，并非偶然。它反映了处于不同发育历期的幼虫、虫草菌的氨基酸、微量元素组成水平与虫草相互间的亲疏关系和不同发育历期的组合特征，更体现了自然生长的幼虫在发育至特定龄期时有相当一部份易被虫草菌感染、形成冬虫夏草的规律性。我们曾观察到，自然条件下 4 、5 龄幼虫尤以 5 龄最易受到虫草菌感染。而本文的聚类结果亦显示 5 、4 龄幼虫的氨基酸、微量元素组成水平与全虫草的最为接近，不难理解这一结果与其易被感染形成冬虫夏草不无联系。因为事实上虫草菌是以寄主昆虫作为培养源的。此外，虫草菌丝体以培育至晚期的更为接近子实体的孢子，而人工感染实验结果亦表明：晚期的菌丝体更易感染寄主；自然条件下则是以孢子感染寄主。因而我们的结果似可间接说明：

微量元素和氨基酸的组成与感染有一定联系。计维浓（1987）的研究结果证实：植物都有选择吸收元素的能力，每种植物吸收的离子，或者说要求养料中的微量元素组成结构，都有着特定的比例。我们的结果显示：5、4龄幼虫的氨基酸、微量元素的组成水平很可能最适合虫草菌的生长发育。不难设想，生物体内的任何大、小分子物质尽管千差万别，但氨基酸和元素均是组成它们的基本单位。尽管在生物个体长期的生长发育过程中，许多元素不同程度地参与了生物体内的氧化、还原、交换吸附、溶解与沉淀、生物合成、吸收与降解等生化反应和迁移过程，引起元素的重新搭配和组合，形成新的化合物；氨基酸的参与亦类似。因而养料中的元素、氨基酸组合毕竟不同于虫草菌中的组合。但是，菌丝体中的元素必定是由寄主的体内吸收而来；其氨基酸有的来自于虫体，有的可能是虫草菌自身合成，但必然都受到营养源的制约。因此，其组成水平与寄主的组成结构有密切的内在联系，所以虫草菌与适合其寄生的寄主的化学元素、氨基酸关系就显得相对较亲近。因而在进行人工培养虫草菌和感染寄主幼虫时，考虑到这些因素是很重要的。

此外，进行个体差异实验时发现，尽管在个别同组样品间的微量元素、氨基酸组成指标上存在着一定量的差异，但其总体组成水平差异不显著。然而不同的幼虫发育历期、虫草菌丝体间的历期之间的组成水平都不相同，大多数间的差异还较大。这一结果可理解为幼虫和虫草菌在不同的发育历期中对各种元素和氨基酸的需要量不同，因此在同种生物不同发育历期间对各种元素和氨基酸的累积量有高低之分。还有一种可能是由于该虫和菌的生长发育历期都较长。观察表明，虫草蝠蛾幼虫一个完整的发育历期约需2—3年左右；虫草菌孢子一般在7—8月感染寄主幼虫，至次年5—6月份才长出子实体，多在7—8月份成熟，说明其历期约在一年左右。虫草自然分布区多在3800m以上的高海拔地带，一年四季的温湿度变动幅度大，冬、夏季的温差可高达50°C左右，幼虫分布的土层湿度变动范围在25—50%的含水量之间，每年有5—7个月的冻土期。因而它们必然随季节变动调整自身的营养结构，从而造成其氨基酸、微量元素组成水平的变化和重组。观察资料显示：成虫一般在6月下旬至8月中下旬产卵孵化，1—2龄虫主要发生在9月上旬至次年5月上旬间；3龄幼虫一般发生在5—10月；4—6龄在一年四季均有发生，但多集中在6—9月。不同龄期的发生有季节上的差异。由此看来，由于环境因素导致它们的微量元素、氨基酸组成水平的差异是不难理解的，可以认为是由于长期适应生存环境的结果。因此，在进行人工饲养该幼虫，虫草菌以及人工感染研究、培育冬虫夏草时，考虑到以上因素是很有必要的。

最后必须指出，元素和氨基酸在生物体内的分布是不均匀的，能确切反映其有效状况的应当是整个生物个体的总吸收或合成量。

参 考 文 献

计维浓等　1987　太湖流域主要粮食作物中19种元素的背景值及其特征。　环境科学学报　7(1):86—91。

刘多森等　1979　主组元素分析在分辨土壤型及风化——成土过程上的应用(以水稻土为例)。土壤学报　16(2):173—179。

何纪昌等　1984　白鱼属鱼类的数值分类包括二新种和一新亚种的描述。　动物分类学报　9(1):100—108。

孟宪玺等　1987　东北平原中部地区土壤环境中若干元素的群分析。　科学通报　17:1325—1329。

杨跃雄等 1987 冬虫夏草及其寄主昆虫、虫草菌丝体中微量元素的分析。中草药 10(6):19—27。
杨跃雄等 1988 几种虫草成份的比较研究。云南中医杂志 9(1):33—35。
杨跃雄等 1988 关于虫草的药理、药化研究概况和展望。 资源昆虫 2(4):27—32。
杨跃雄等 1988 人工培养虫草菌丝体的电泳鉴定——一种筛选虫草菌的方法。中草药 19(9):28—31。
杨跃雄等 1989 群分析在研究虫草蝙蝠蛾生长发育中的应用初探。 动物学研究 10(2):88。
杨跃雄等 1989 虫草菌感染虫草蝙蝠蛾幼虫的研究。 动物学研究 10(3):227—231。
Cipra, J. E. *et al.* 1980 Numerical taxonomy of soils from nine orders by cluster and centroid-component analyses. *Soil Sci. Amer. Proc.* 34(2):281—287.
Cuanalo, H. E. *et al.* 1970 A comparative study of numerical classification and ordination of soil profiles in a locality near Oxford. *J. Soil Sci.* 21(2):340—352.
Kirbright, C. F. *et al.* 1974 Atomic absorption and fluorescence spectroscopy. Academia press Inc. New York.
Kyuma, K. *et al.* 1976 Soil material classification for paddy soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* 22(2):111—124.
Webster, B. R. *et al.* 1977 Quantitative and numerical method in soil classification and survey. Clarendon Press, Oxford. New York.
Рожов, В. А., Прошина, Н. В. 1977 Опыт численной таксономии почв. Почвоведение, No. 8, 106—116.

THE INFLUENCE OF TRACE ELEMENTS AND AMINO ACIDS ON THE LARVAE WERE INFECTED BY CHINESE "INSECT HERB" FUNGS (*CORDYCEPS SINENSIS*)

Yang Yuexiong Lu Yuan Yang Darong Dong Dazhi
Shen Farong He Yanhuei Wang Darui Han Denbao
(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The present paper deals with a preliminary exploration for the studies on background values of 18 elements and 17 amino acids in Chinese "insect herb" (*Cordyceps sinensis*) by using mathematical method of cluster analysis. From five groups of ghost moths' larvae of different instars, four groups of Chinese "insect herb" mycelia were grown on the medium, parasitized larva and the sporocarps of *Cordyceps sinensis*, were divided into 12 genera. According to coefficients of distance matrix among the samples, the 12 genera originally classified can beg reclassified into 3 genera at 8.66 distance level through cluster analysis. The results obtained are:

1. The constituents of fourth and fifth instar larva, on the elements and amino acids, approached that of Chinese "insect herb" (*Cordyceps sinensis*).

2. It is necessary to use the old mycelia of Chinese "insect herb" fungus, grown on the agar medium, or spores of *Cordyceps sinensis* as a test sample were the most suitable to infect the hepialid larvae.

Key words: Hepialid larvae, Chinese "insect herb" fungus, Amino acid, Trace element, Cluster